Istituto di Patologia generale della R. Università di Bologna
diretto dal prof. G. TIZZONI

Sul modo di determinare la potenza del siero antitetanico col metodo della mescolanza in vitro.

Prof. GUIDO TIZZONI

(*Lavoro estratto dalla* Riforma Medica, *N. 242-243-244-245-246, Anno XV*)

PALERMO
Riforma Medica
1899

Istituto di Patologia generale della R. Università di Bologna
diretto dal prof. G. TIZZONI

Sul modo di determinare la potenza del siero antitetanico col metodo della mescolanza in vitro.

Prof. GUIDO TIZZONI

(*Lavoro estratto dalla* Riforma Medica, *N. 242 243-244-245-246, Anno XV*)

PALERMO
Riforma Medica
1899

In un mio precedente lavoro ho stabilito che nella determinazione del potere immunizzante del siero antitetanico, come in quella del siero antidifterico, il metodo della mescolanza in vitro è da preferirsi per maggiore esattezza e sollecitudine al metodo in cui siero e tossina sono iniettati separatamente negli animali con intervallo di 24 ore, ed ho indicati gli errori che dall'applicazione di questo ultimo possono derivare.

Anche il Behring oggi conviene pienamente in questa opinione; tanto che negli ultimi suoi lavori dichiara di avere intieramente abbandonato il metodo che determina preventivamente il valore immunizzante del siero, del quale fino a questi ultimi tempi si era sempre servito, per ricorrere a quello che ne rileva il valore antitossico col mezzo della mescolanza in vitro. Anzi in questi suoi lavori, specie nell'ultimo, dá norme esatte, molto particolareggiate, per determinare il valore del veleno-campione o veleno-tipo (Testgift), e per stabilire le condizioni in cui il metodo della mescolanza può fornire risultati precisi e costanti.

A torto poi egli rivendica a sè questo metodo, per il solo fatto che esso trova il suo fondamento nella proprietà antitossica del siero da lui scoperta insieme al Kitasato, perchè devesi effettivamente ad Ehrlich, Kossel e Wassermann se la mescolanza di siero e tossina, usata da questi AA. nella determinazione del siero antidifterico, fu adoperata per la prima volta con intento scientifico e pratico.

Ma anche il metodo della mescolanza in vitro per dare risultati sicuri richiede che si verifichino speciali condizioni, e fra queste, prima di tutte per importanza, quella di possedere un veleno-campione costante.

Ora, mentre questo è molto facile ad ottenersi nella difterite, perchè la rispettiva tossina gode di una forte stabilità (tanto che i filtrati delle culture conservano a lungo inalterato il loro potere tossico, specie se convenientemente mantenute al riparo dall'aria e dalla luce) invece la tossina del tetano è molto labile; per la più piccola influenza gradatamente s'indebolisce e finisce per divenire completamente o quasi completamente inattiva.

Non vi ha dubbio che il tetano, sia per la ricerca scientifica, come per la fabbricazione del siero curativo, presenta difficoltà incomparabilmente superiori a quelle della difterite; e in ciò sta

forse la ragione per la quale la produzione del siero antitetanico non ha potuto avere finora la stessa diffusione di quella del siero antidifterico.

Tali difficoltà consistono principalmente in questo; in una maggiore oscillazione nella produzione della tossina dalle culture, nella minor fissità o costanza del veleno-campione e nella maggior facilità con cui nella vaccinazione contro il tetano, specie se praticata su cavalli di razza nostrana, s' incontrano soggetti che danno un siero di valore insufficiente, perfino animali che dopo una vaccinazione protratta oltre un anno e mezzo non contengono nel sangue nulla o quasi di materiali immunizzanti.

In questo lavoro ci occuperemo delle difficoltà che vengono dal veleno-campione.

Senza un veleno-campione costante non è in nessun modo possibile orientarsi nelle ricerche scientifiche sul tetano; come non è possibile arrivare ad un' esatta determinazione del siero che si prepara dagli animali vaccinati in servizio della pratica.

Nè può davvero immaginarsi pena maggiore di esperienze fatte con un veleno che cambia nelle mani di chi l'esperimenta e di cui al momento voluto non è dato conoscere il grado preciso della potenza. Le ricerche eseguite in queste condizioni riescono lunghe, laboriose, spesso contradittorie, malsicure, errate; le conclusioni che se ne ricavano sono più indotte che dimostrate; manca la possibilità d'istituire serie continue di esperimenti, e i pochi risultati certi a cui si arriva si ottengono quasi di sorpresa in mezzo ad una farraggine di osservazioni che non servono a nulla per difetto in più o in meno della dose di veleno adoperata.

Mancando, poi, nella determinazione del siero antitetanico un punto fisso di paragone, non sarà affatto possibile comparare fra loro i risultati di osservazioni ripetute più volte sopra lo stesso animale a determinato intervallo di tempo o praticate separatamente sopra soggetti differenti; nè riescirà più attendibile il confronto fra il valore di questi sieri e quello di sieri preparati da altri.

Ed io credo debbasi per la massima parte a questa ragione se le ricerche scientifiche sul tetano non hanno finora proceduto con quella speditezza a cui avrebbe dovuto portare la somma di lavoro impiegato, e se nel controllo di un siero frequentemente è risultato un valore diverso da quello che gli era stato attribuito.

Alle culture del tetano non è nemmeno da pensare per ottenere una tossina costante. Già le culture del tetano, dopo aver raggiunto fra il 7° e il 15° giorno del loro sviluppo il massimo di velenosità, perdono gradatamente del loro potere tossico anche se conservate chiuse e mantenute in ambiente freddo al riparo dalla luce.

Nei filtrati, poi, l'indebolimento del potere tossico si verifica in proporzione assai maggiore e con maggiore rapidità; e ciò, secondo pensa il Behring, in seguito ad una ossidazione del veleno. Nè vale per impedire questa scomposizione di sovrapporre alla cultura appena filtrata un grosso strato di olio o di toluolo, d'aggiungervi glicerina o di conservarla al vuoto o sotto gas indifferenti. I molti tentativi che io ho fatto in proposito nel vol-

gere di questi ultimi anni, mi hanno dimostrato che anche in tali condizioni i filtrati perdono rapidamente una parte del loro potere tossico.

Di ciò convengono tutti gli sperimentatori, meno il Courmont, il quale afferma potersi ottenere facilmente una tossina fissa sovrapponendo alla cultura del tetano filtrata uno strato di olio. Nè saprei davvero come questa eccezione possa spiegarsi.

Riconosciuta l'impossibilità di mantenere costante il potere tossico delle culture liquide, si pensò di raggiungere questo intento col ridurre la tossina allo stato solido.

Varii mezzi a tal uopo furono proposti. Da prima si fece ricorso al disseccamento semplice, svaporando la cultura del tetano al vuoto, a bassa temperatura (20°-22° C.). Ma questo processo di cui io e Kitasato ci siamo serviti quasi contemporaneamente nei nostri primi esperimenti, l'uno indipendentemente dall'altro, non rispose in modo completo alla nostra aspettativa. Il prodotto cosí ottenuto, che ha l'apparenza di scagliette giallo-brune, perde poco a poco, anche se conservato al vuoto, al riparo dalla luce, una parte della sua tossicità primitiva, per quanto, a parità di condizioni, ciò avvenga assai più lentamente che nelle culture liquide. Evidentemente rimane nel disseccato qualche sostanza che in modo lento e graduale esercita una azione scomponente sul veleno del tetano, o questo, pure allo stato secco, è suscettibile di risentire l'influenza degli agenti esterni.

Così il processo del disseccamento per ottenere dalle culture un veleno costante dovè essere presto abbandonato.

Migliore fortuna non ebbe il processo di Brieger e Fränkel della precipitazione della tossina a m zzo dell'alcool assoluto, perchè le mie esperienze, le quali più tardi trovarono piena conferma in quelle di Buchner, dimostrarono subito dopo che in questa precipitazione, specie se ripetuta più volte, il veleno del tetano viene totalmente scomposto.

In questo stesso lavoro Brieger e Fränkel avevano dimostrato la possibilità di preparare dalle culture una sostanza tossica secca colla precipitazione a mezzo del solfato d'ammonio. Questa dimostrazione fu data pienamente per la difterite, per lo stafilococco aureo, per il tifo ecc. ma per il tetano non risulta che fosse fatta la prova; anzi dall'insieme del contesto sembra che questi AA. nei loro esperimenti sul tetano si sieno valsi esclusivamente della tossina ottenuta colla precipitazione praticata coll'alcool assoluto.

Subito dopo io applicai alle culture del tetano il metodo di Brieger e Fränkel, e per primo dimostrai, che, colla precipitazione a mezzo del solfato di ammonio, si può ricavare anche da queste culture una tossina solida.

I tedeschi erroneamente attribuiscono al Buchner il merito di tale dimostrazione, nonostante che questi in una polemica avuta col Brieger abbia lealmente riconosciuto che a me spetta il diritto di priorità nella preparazione del veleno del tetano allo stato solido.

Ma la precipitazione col solfato di ammonio corrisponde effettivamente allo scopo di dare un veleno solido assolutamente inalterabile, quale è richiesto dalle attuali esigenze degli studî sul tetano e per la giusta valutazione del siero antitetanico?

Secondo afferma il Buchner sembrerebbe di sì. Infatti egli riferisce che il suo assistente, il Dr. Rapp, potè ottenere con questo metodo di preparazione una polvere bianca che per più mesi conservò inalterata la sua potenza tossica.

Invece la larga e diligente esperienza che io ho potuto fare al riguardo in molti anni di ricerche sul tetano ha modificato sostanzialmente le mie prime convinzioni, provandomi, senza eccezione nessuna, che la semplice precipitazione con solfato d'ammonio, od anche con solfato d'ammonio e di sodio come pratica il Buchner, non serve a dare una tossina del tetano assolutamente costante.

A dimostrazione del fatto riporto quì i risultati di alcune esperienze che ebbi occasione di fare in questi ultimi tempi.

Il giorno 8, IV, 98 filtro una cultura di 25 giorni, lasciata 13 giorni alla stufa, e precipito con solfato d'ammonio. Il filtrato di questa cultura alla dose di cm^3 0,001 per klg. uccide il coniglio in 4 giorni. Col precipitato disseccato al vuoto faccio sul coniglio i seguenti esperimenti:

5, V, 98 — (1).
gr. 0,00002 p. klg. + 16 giorni
» 0,00003 » » + 5 »
» 0,00005 » » + 4 »
» 0,00007 » » + 3 »
» 0,00010 » » + 3 »

14, V, 98
gr. 0,00003 p. klg. (≡)

19, V, 98
gr. 0,00003 p. klg. (≡)
» 0,00004 » » + 7 giorni

31, V, 98
gr. 0,00003 p. klg. (—)
» 0,00009 » » + 11 giorni

7, VI, 98
gr. 0,00004 p. klg. (—)
» 0,00004 » » (—)

13, VI, 98
gr. 0,00004 p. klg. (—)
» 0,00006 » » + 13 giorni
» 0,00008 » » + 15 »

21, VI, 98
gr. 0,00006 p. klg. (≡)

27, VI, 98
gr. 0,00006 » » (—)

1, VII, 98
gr. 0,00006 » » (—)

14, VII, 98
gr. 0,00006 » » (—)

(1) Il segno (—) indica la presenza di fenomeni locali del tetano di mediocre gravezza (fino alla semiestensione dell' arto operato); il segno (=) significa fenomeni locali più gravi (estensione completa e aumento della eccitabilità della parte inoculata): il segno (≡) esprime il quadro del tetano generalizzato; il segno + rappresenta l' esito letale e il segno O indica che l' animale in esperimento non ha risentito nulla della praticata iniezione.

2, IV, 99
gr. 0, 00006 p. klg. (—)

Dunque questa tossina che il 5, V, 98 uccide in 5 giorni alla dose di 0,00003 p. klg., dopo 9 giorni alla stessa dose non dà più che un tetano grave ma non mortale, dopo 26 giorni con una dose tripla, cioè di 0,00009 per klg., uccide in 11 giorni di forma cronica, dopo 53 giorni con dose doppia determina solo fenomeni locali. E la stessa dose seguita a dar fenomeni locali per un tempo abbastanza lungo.

Il giorno 26, I, 99 filtro e precipito con solfato d'ammonio una cultura di tetano di 10 giorni di cui 0,001 cm³ p. klg. uccide il coniglio in 3ª giornata; 125 cm³ di questa cultura danno gr. 1,5 di tossina secca. Con questa tossina sono fatti i seguenti esperimenti, tutti praticati sul coniglio:

29, I, 99
gr. 0,00001 p. klg. + 4 giorni
» 0,00002 » » + 4 »
» 0,00005 » » + 3 »

2, II, 99
gr. 0,000005 p. klg. + 10 giorni
» 0,00001 » » + 7 »

6, II, 99
gr. 0,000008 p. klg. (—)
» 0,00001 » » (—)

9, II, 99
gr. 0,00001 p. klg. 0
» 0,00003 » » (—)

Così anche questa tossina in 11 giorni ha perduto oltre tre volte della sua tossicità.

Il giorno 11, II, 99, filtro e precipito con solfato d'ammonio una cultura di 7 giorni di cui 0,001 cm³ p. klg. determina la morte del coniglio in 4 giorni; cm³ 230 di filtrato danno gr. 2,746 di tossina secca.

Con questa tossina pratico nel coniglio i seguenti esperimenti:

12, II, 99
gr. 0,000008 p. kgl. + 5 giorni
» 0,00001 » » + 3 »

15, II, 99
gr. 0,00001 p. klg. (—)

18, II, 99
gr. 0,00001 p. klg. (—)
» 0,000015 » » (—)

Quindi questa tossina ha perduto in 6 giorni oltre la metà del suo potere patogéno.

Da questi esperimenti, e da molti altri che per amore di brevità mi astengo dal riportare, risulta, perciò, che la precipitazione col solfato di ammonio non fornisce il mezzo di preparare una tossina costante; che anzi la tossina così ottenuta si altera abbastanza rapidamente.

La polvere bianca che si ricava con questo processo, anche se conservata al vuoto sopra acido solforico e mantenuta al riparo dalla luce, dapprima perde una parte del suo potere tossico in modo abbastanza rapido, poi in modo più lento, e in ultimo in

modo così lento che con la stessa dose si possono provocare nel coniglio per molti mesi fenomeni tetanici della medesima gravezza.

Perciò, dopo avvenuta la primitiva scomposizione del veleno si può avere l' illusione di possedere per qualche tempo una tossina costante, mentre effettivamente non si ha che un veleno, attenuato, il quale procede nel suo ulteriore indebolimento in modo lentissimo, e contiene per di più una quantità molto grande di veleno trasformato, capace di turbare grandemente i risultati dello esperimento. E quale importanza abbia questo veleno trasformato nella determinazione della potenza del siero, lo vedremo chiaramente più sotto.

Di questa alterazione che subisce la tossina secca del tetano ottenuta colla precipitazione a mezzo del solfato di ammonio sembra che per un momento si fosse accorto anche il Brieger, il quale nel descrivere i caratteri, le proprietà di questo veleno, i metodi per procedere alla sua depurazione, scrive: « il nostro « veleno secco del tetano, depurato, non é molto resistente contro « gli agenti chimici e fisici. Anche la sua conservazione al riparo « dall'aria, dalla luce e dalla umidità non basta ad evitare la sua lenta decomposizione ».

Ma nel medesimo volume dello *Zeitschr. f. Hygiene* lo stesso A. contraddice questa opinione e riconosce la possibiiità di avere un veleno del tetano che si mantenga costante.

Per spiegare poi la differenza del giudizio dato a così breve distanza sulla stabilità o meno della tossina del tetano, il Brieger trascura affatto la circostanza che il secondo campione studiato, dopo la precipitazione con solfato di ammonio, fu sottoposto a dialisi; invece ammette in una breve nota che nella osservazione precedente la scomposizione del veleno fosse dovuta alla sua insufficiente protezione dall'aria, dalla luce e specialmente dalla umidità.

Behring ha esaminato 10 campioni di veleno del tetano di diversa provenienza, ed ha trovato che il maggior numero di questi, anche dopo mesi ed anni di conservazione, non lasciavano riconoscere nessuna variazione nel titolo della loro velenosità, e si mantenevano quasi così costanti come il chinino, la morfina ed altri veleni cristallini; solo in alcuni (veleno N. 2) potè constatare un lento e progressivo indebolimento della loro potenza. Il Behring non dice, peraltro, se a questa diversa stabilità del veleno corrispondono differenze nei caratteri batteriologici delle culture, nella loro azione patogena studiata comparativamente nei vari animali, ciò che sarebbe stato importante conoscere per quello che avremo a riferire più sotto. In ogni modo emerge da tali ricerche che dalle culture del tetano si possono ricavare due qualità di tossina, una costante, e una che più o meno rapidamente si scompone.

Ma da cosa dipende questa alterazione del veleno del tetano ridotto allo stato secco e conservato nelle migliori condizioni?

A tal riguardo io ho potuto notare che la diminuzione rapida della velenosità della tossina ottenuta col solfato di ammonio è sempre accompagnata dalla comparsa nel precitato di una reazione acida. Precipitati che al momento in cui furono messi a seccare avevano reazione decisamente alcalina, tolti dopo 1-2

giorni di sotto la campana, davano reazione acida evidentissima, e dimostrabile, non solo con l'acido rosolico, ma anche con le comuni carte reattive. Di più posso affermare che questa reazione acida andava progressivamente crescendo a misura che diminuiva il potere tossico del precipitato.

Non occorre faccia rilevare che per questa precipitazione io adoperava sempre sale d'ammonio purissimo, a reazione assolutamente neutra, che provvedevo direttamente dalla Fabbrica Merck di Darmstadt.

Quindi è fuori dubbio che la comparsa della reazione acida accompagna l'indebolimento del veleno secco del tetano dopo la sua precipitazione con solfato di ammonio. Quale rapporto passi, poi, fra questi fatti non mi è dato affermarlo in modo positivo; per quanto, dopo la dimostrazione da me data in un altro lavoro che gli acidi, tanto organici quanto, minerali, esercitano sulla tossina del tetano una rapida e profonda azione scomponente, rendano molto probabile l'ipotesi che allo sviluppo di una sostanza acida debbasi il graduale indebolimento del veleno secco del tetano.

Per rimediare a questi inconvenienti il Dr. Knorr propone di sciogliere il precipitato ottenuto col solfato di ammonio in una soluzione di cloruro di sodio al 10 0[0. Ed è così infatti che egli prepara la tossina costante quale è adoperata nelle sue ricerche e in quelle del Behring, quale si usa oggi in Germania per determinare il valore del siero antitetanico.

Ma se questo processo può servire a mantenere costante la tossicità della soluzione, per quanto sia tutt'altro che provato che nelle soluzioni di cloruro di sodio il veleno del tetano sia più resistente agli agenti chimici e fisici, non vale egualmente ad impedire la scomposizione che si opera nel veleno stesso durante il suo disseccamento e che dà luogo a prodotti (tossoidi di Ehrlich) (*) i quali possono turbare l'esattezza della ricerca, come anche il Behring ebbe a riconoscere.

L'importanza poi di una soluzione inalterabile di veleno è molto secondaria di contro a quella di una tossina solida costante, potendosi la soluzione preparare fresca di volta in volta che occorra, come io pratico sempre nelle mie ricerche.

Ma come si può rimediare a questo grave inconveniente ed ottenere una tossina solida stabile?

Nel dubbio che la lamentata scomposizione del veleno sia dovuta alla presenza del solfato d'ammonio rimasto nel precipitato, ho cercato di eliminare questo sale quanto più era possibile, asciugando rapidamente il precipitato stesso sopra porcellana porosa prima di metterlo a seccare. Ma neanche questa precauzione ha valso a raggiungere il fine desiderato, e la tossina così ottenuta non si è mostrata molto più stabile della precedente. Invece ho ottenuto risultati molto soddisfacenti colla eliminazione del solfato di ammonio a mezzo della dialisi.

Già io conosceva per le mie antecedenti ricerche che la tossina del tetano non dializza, cosa stata prima contradetta poi confermata in Germania ed in Francia.

(*) Ehrlich ha dato il nome di tossoidi a dei prodotti atossici della cultura che derivano da scomposizione della tossina e che sono capaci di fissare l'antitossina.

Restava quindi a vedere se l'eliminazione rapida del solfato d' ammonio fatta a mezzo della dialisi valesse effettivamente ad impedire la scomposizione della tossina di sopra lamentata.

Ecco come procedo in questa operazione. Filtro per candela Berkefeld una cultura arrivata al massimo della sua tossicità, precipito due volte la tossina con solfato di ammonio, quindi ridisciolgo il precipitato in acqua distillata sterilizzata, o in soluzione di cloruro di sodio 1 0|0, e metto la soluzione a dializzare in acqua corrente entro dializzatori tubulari dei quali era stata provata precedentemente la perfetta tenuta. Dopo 24 ore di dialisi svaporo al vuoto alla temperatura di 20-22° C. il liquido contenuto nel dializzatore, e per ultimo metto il residuo a disseccare al vuoto sopra acido solforico.

La tossina secca che si ottiene con questo processo ha l'aspetto di una resina; si presenta in scagliette lucenti giallo-brune molto simili a quelle che si hanno col semplice disseccamento della cultura. Colla polverizzazione si produce da queste scagliette una polvere bruna molto igroscopica, la quale appunto per questo suo colore si distingue facilmente da quella bianca che si ottiene quando alla precipitazione con solfato d'ammonio non si fa seguire la dialisi.

La reazione di questa tossina è sempre neutra, o leggerissimamente alcalina, e tale si mantiene anche dopo molto tempo da che fu preparata. Anche la sua velenosità è costante, almeno tale si mantiene per un tempo abbastanza lungo se la tossina così preparata si conserva al riparo dalla luce, dall'aria e dall'umidità, come dimostrano chiaramente gli esempi seguenti.

Le ricerche al riguardo sono state fatte su due campioni di tossina ottenuti, uno da una cultura del tetano vecchia di un anno, e uno da una cultura recente.

Per amore di brevità delle due serie di esperienze riporterò per esteso solo quella più completa.

La tossina che ha servito per queste ricerche era stata preparata il 7, III, 99, da una cultura di tetano di 15 giorni di cui cm^3 0,001 p. klg. uccideva il coniglio in 4 giorni. Da 200 cm^3 del filtrato di questa cultura si erano ricavati gr. 4,86 di tossina secca. Nella tabella seguente sono riportati i risultati degli esperimenti praticati con questa tossina ed eseguiti tutti sul coniglio.

Giorno dello esperimento	Peso dell' animale in grammi	Quantità della tossina iniettata per Klg.	Risultato
11, III, 99	1340	0,00003	+ 3° giorno
» »	1490	0,00002	+ 5° »
19, III, »	1450	»	+ 5° »
22, III, »	1800	»	+ 5° »
26, III, »	1090	»	+ 6° »
3, IV, »	1100	»	+ 6° »
8, IV, »	900	»	+ 5° »
15, IV, »	1150	»	+ 5° »
20, IV, »	1190	»	+ 4° »
14, V, »	1310	»	+ 4° »
21, V, »	1220	»	+ 4° »
19, VI, »	1700	»	+ 4° »

Anche la tossina ottenuta dalla cultura del tetano vecchia di un anno si è mostrata costante per più mesi; alla dose di gr. 0,00005 p. klg. ha ucciso il coniglio in 4 giorni senza eccezione nessuna.

Con questo metodo, adunque, si può preparare facilmente una tossina costante, o almeno una tossina che può mantenersi tale per un tempo abbastanza lungo, e sufficiente per eseguire con essa quelle esperienze che possono occorrere in una determinata serie di ricerche.

Che se anche in questo caso la stabilità del veleno non fosse indefinita, come i risultati delle ultime osservazioni lascerebbero sospettare, ma la tossina così preparata dovesse subire col tempo qualche modificazione (modificazione che sembrerebbe doversi principalmente attribuire ad una eccessiva elevazione della temperatura ambiente) ciò non avrebbe grave peso, visto la facilità con la quale questa tossina può prepararsi, e conosciute esattamente le condizioni per le quali, come vedremo in seguito, si possono avere culture di tetano sempre allo stesso grado di alta tossicità (culture a tossicità fissa), cioè capaci di uccidere il coniglio in 4 giorni alla dose di cm^3 0,001 p. klg.

Questo è il processo che mi ha dato migliore risultato per la preparazione del veleno-tipo (Testgift); processo al quale sono arrivato dopo molti tentativi infruttuosi e in seguito a lungo e paziente lavoro.

Qualsiasi altro trattamento non ha valso a rendere stabili le culture del tetano o ad impedire la scomposizione del veleno secco. Se devesi quindi giudicare dalla maggiore facilità con la quale altri ha raggiunto questi risultati, e dalla maggior lentezza con la quale in casi meno favorevoli fu trovato effettuarsi la scomposizione del veleno, bisogna ritenere che la mia tossina del tetano sia molto ma molto più labile di quella che si prepara in altri laboratori; ciò che costituirebbe fra i due prodotti un nuovo carattere differenziale da aggiungere agli altri che saranno più sotto enumerati.

Il processo che ho sopra descritto, oltre a servire per la preparazione del veleno-campione, vale benissimo, altresì, per concentrare il materiale da iniettare negli animali. E di questo metodo mi sono servito appunto per introdurre nei cavalli in vaccinazione quantità molto grandi di tossina, corrispondenti fino a 500 cm^3 di cultura del tetano. Quale vantaggio si possa ottenere con tale metodo nella pratica della vaccinazione quando l'iniezione viene praticata in soggetti adatti alla produzione del siero e convenientemente preparati, sarà detto in altro lavoro. Intanto per giudicare della bontà di questo metodo di concentrazione e per risalire facilmente al valore della U T del prodotto secco, una volta conosciuta la tossicità della cultura della quale è stato ottenuto, è importante esaminare se nella preparazione della tossina secca si hanno perdite apprezzabili oppur no.

Le prove fatte in proposito sul rapporto fra la tossicità della cultura e quella proporzionale del ricavato solido mi hanno ripetutamente dimostrato che nella preparazione del veleno secco del tetano col processo che è stato di sopra indicato, non si verificano perdite di parte attiva da tenere a calcolo. Un esempio di questa affermazione può trovarsi anche nei dati che sono stati precedentemente riportati nel parlare del veleno preparato il 7, III, 99. Infatti se 200 cm^3 di una cultura di cui 0,001 cm p. klg. uccide il coniglio in 4 giorni danno gr. 4,80 di tossina solida, gr. 0,000024 di questa tossina deve rappresentare l' U T del veleno secco corrispondente negli effetti a cm^3 0,001 della cultura liquida. Invece l' U T trovata praticamente sarebbe un poco minore, sarebbe cioè di gr. 0,000020 p. klg; ma se si considera che con tale dose la morte dell'animale avviene costantemente in 5 giorni, mentre con cm^3 0,001 p. klg. della corrispondente cultura avveniva in 4, si trova pienamente giustificata la differenza in meno riscontrata nella U T del prodotto solido.

Esclusa qualsiasi perdita nella preparazione del veleno secco del tetano, rimane facile in ogni caso risalire, con un semplice calcolo, dal valore tossico della cultura a quello della tossina che se ne ricava.

Le perdite che io aveva trovato in altre ricerche nella precipitazione del veleno a mezzo del solfato d'ammonio, perdite che io aveva calcolate allora a circa $^2/_5$ del veleno totale, riconoscono certamente la loro ragione in quanto è stato detto di sopra sul modo di comportarsi della tossina del tetano quando il sale di ammonio non è rapidamente eliminato colla dialisi subito dopo praticata la precipitazione.

La determinazione del valore antitossico del siero fatta con questa tossina fissa mi ha dato sempre risultati superiori ad ogni aspettativa tanto per l'esattezza quanto per la costanza; ciò che non si verifica, invece, quando tale determinazione è fatta con veleno la cui potenza, al momento di adoperarlo, non sia esattamente conosciuta, a causa della lenta e continua scomposizione alla quale va soggetto.

Di questo mi sono potuto convincere nelle numerosissime valutazioni che ho avuto occasione di praticare sul sangue dei miei cavalli vaccinati contro il tetano, e specialmente nel caso in cui ho dovuto ripetere più volte la prova sopra uno stesso

siero con vario intervallo di tempo fra l'una e l'altra valutazione.

Potrei riportare in proposito molte osservazioni; ma per amore di brevità voglio limitarmi solo alle due seguenti, alle quali del resto tutte le altre si rassomigliano per regolarità ed esattezza.

1ª *Serie* — 22, III, 99. Coniglio di gr. 1970.

Iniezione della mescolanza di siero raccolto dal cavallo Cariddi il 16, II, 99 e tossina secca costante del 7, III 99 (U T = grammi 0,00002 p. klg.) nella proporzione di 80.000 U T per cm³ di siero.

L'animale in seguito a questa operazione non ha presentato mai fenomeni di tetano; non si è avuto nemmeno abbassamento di peso.

22, III, 99. Coniglio di gr. 2040.

Iniezione come sopra, ma nella proporzione di 100.000 U T per cm³ di siero.

L'animale presenta fenomeni di tetano localizzati all'arto operato, fenomeni che crescono nei primi 4 giorni di esperimento, ma che dopo regrediscono gradatamente fino alla loro completa scomparsa. Si nota anche una diminuzione del peso di gr. 300.

Controllo operato nello stesso giorno e colla stessa diluzione di tossina che ha servito nei due esperimenti precedenti, nella dose di grammi 0,00002 di veleno p. klg. (U T) muore in 5 giorni.

2ª *Serie* — 3, IV, 99. Coniglio di gr. 1150.

Iniezione di una mescolanza di siero raccolto dal cavallo Cariddi il 16, II, 99 e veleno secco costante del 7, III, 99 (U T = 0,00002 p. klg.) nella proporzione di 80.000 U T per cm³ di siero.

L'animale non presentò mai fenomeni di tetano, e nemmeno diminuzione del peso del corpo.

3, IV, 99. Coniglio di gr. 1120.

Iniezione come sopra ma nella proporzione di 100.000 U T per cm³ di siero.

Al 2° giorno l'animale presentò fenomeni di tetano localizzati all'arto iniettato, fenomeni che lentamente si generalizzarono e determinarono la morte in 7ª giornata.

Controllo fatto nello stesso giorno dei precedenti e colla stessa diluzione di tossina, nella quantità equivalente alla U T (gr. 0,00002 p. klg.) muore in 5 giorni.

Dunque la determinazione dello stesso siero fatta alla distanza di 10 giorni ha dato esattamente lo stesso valore di 80.000 U T. Sulla ragione delle differenze osservate nei due esperimenti comparativi in cui fu sperimentato il valore di 100.000, sarà tenuto parola più sotto.

Ma, come ho già precedentemente accennato, perchè i risultati sulla determinazione del siero abbiano l'esattezza e la costanza voluta. oltre alla presenza di un veleno fisso, occorre siano realizzate anche altre condizioni. Queste si riferiscono, *tanto alla tossina*, *quanto all' animale nel quale è praticata la iniezione.*

Per riguardo alla tossina devono tenersi in conto i seguenti fatti:

I. *Potenza del veleno.*—Il diverso grado di tossicità di una cultura, rispettivamente la forza differente di una tossina, può essere tanto originale o primitiva quanto secondaria. È secondaria

quando la debole potenza della tossina è il risultato dell'invecchiamento della cultura o dell'azione scomponente esercitata sul veleno da particolari cause chimiche o fisiche.

Io non ho potuto fare esperienze su culture a diversa tossicità originale, perchè tutte le mie culture posseggono a un dipresso la stessa elevata tossicità. Ho dovuto, quindi, limitarmi a sperimentare sopra una tossina indebolita secondariamente nella sua potenza; indebolimento che nel mio caso trovava la sua ragione, o nell'invecchiamento della cultura da cui la tossina stessa era stata preparata, o nella scomposizione che questa aveva subìta in seguito alla sua precipitazione col solfato di ammonio.

Per studiare l' influenza che poteva avere nella determinazione del valore del siero l'indebolimento della tossina dovuto all' invecchiamento della cultura, ho confrontati fra loro i risultati che si avevano da uno stesso siero quando si adoperava una tossina ottenuta da una cultura recente (15 giorni) di cui cm³ 0,001 p. klg. uccideva il coniglio in 4 giorni, e quando si sperimentava sopra una tossina avuta da una cultura vecchia di un anno che originariamente aveva la stessa tossicità della precedente, ma che al momento in cui la tossina fu preparata era, per effetto dell' invecchiamento, considerevolmente indebolita nella sua potenza tossica. L'UT della prima era di gr. 0,00002 p. klg., quella della seconda era invece di gr. 0,00005 p. klg.; quest' ultima era perciò 2 $^1|_2$ volte più debole dell'altra.

I risultati che ho avuto con queste due tossine da più serie di esperimenti sono stati tutti concordanti fra loro; così posso limitarmi a riportare nella seguente tabella solo qualche esempio dei più dimostrativi.

Valore della mescolanza		30.000	40.000	60.000	80.000	100.000	125.000
Siero Cariddi 16, II, 99	Tossina N. 1 UT = 0,00002 p. klg.	0	0	0	0	—	+ 4 g.ni
	Tossina N. 2 UT = 0,00005 p. klg.	0	+ 4 g.ni	+ 3 g.ni	+ 3 g.ni		
Siero Basico 20, 3, 99	Tossina N. 1 UT = 0,00002 p. klg.	0	0	0	+ 7 g.ni	+ 3 g.ni	
	Tossina N. 2 UT = 0,00005 p. klg.	+12 g.ni	+ 3 g.ni	+ 2 g.ni	+ 2 g.ni		

Quindi la misurazione della potenza di un siero fatta con una tossina indebolita per invecchiamento dà un valore assai più basso di quello che si ottiene con una tossina più forte.

In altre parole, quanto più grossa è l'UT, ossia, quanto mag-

giore è la quantità di veleno che l' UT deve contenere per uccidere 1 klg. di coniglio nel termine di 4-5 giorni, tanto più basso apparisce il valore del siero.

Ho creduto dapprima che vi fosse un'assoluta correspettività fra la potenza del siero e la quantità di tossina compresa nella UT, ma in seguito ho dovuto convincermi che ciò non si verifica in modo assoluto.

Il valore del siero, col variare della forza della tossina, non rimane esattamente proporzionale alla grossezza della UT. E che debba esser così si comprende facilmente, perchè le molecole di veleno parzialmente scomposto che sono contenute nella minima dose mortale di una tossina indebolita dall' invecchiamento, non debbono esser legate dalla antitossina con la stessa misura e con la medesima energia delle molecole che posseggono il massimo di velenosità. Probabilmente il grado della neutralizzazione per parte del siero troverà uno dei suoi principali coefficienti nel grado maggiore o minore di scomposizione che il veleno stesso ha subito. Anche la tossina scomposta in seguito alla semplice precipitazione con solfato di ammonio dà luogo ad errori nella misurazione della potenza del siero.

Nella rapida scomposizione a cui la tossina secca va soggetta subito dopo tale precipitazione, le alterazioni sono così profonde e complete che la molecola del veleno perde, insieme al suo potere patogeno, la proprietà di esser legata dall' antitossina. Per cui nella misurazione del siero fatta con dosi di veleno scomposto eguali od anche superiori del doppio alla dose che poco tempo prima uccideva il coniglio in 4-5 giorni, e che per effetto della scomposizione sofferta non determinano più che fenomeni locali di tetano, la quantità di antitossina che viene impegnata nella neutralizzazione del veleno è molto minore, e conseguentemente assai superiore a quello reale apparirà il valore del siero. Ciò risulta chiaramente dagli esempi riportati nella tabella seguente.

Tossina provata	Giorno, mese dell' esperimento	Dose tossina iniettata per klgr.	Risultato nel coniglio	Siero provato	Titolo della mescolanza di siero e tossina				
					80.000	100.000	125.000	150.000	200.000
		grammi							
N. 1 *costante*	17, III, 99	0,00002	+ 5 g.ni	Cariddi 26, I. 99	0	+ 7 g.ni	+ 4 g.ni	—	—
N. 2 *variabile*	20, I, 99	0,00001	+ 4 g.ni	—	—	—	—	—	—
» »	6, II, 99	»	(—)	» »	0	0	(—)	(—)	+ 2 g.ni
		grammi							
N. 1 *costante*	22, III, 99	0,00002	+ 5 g.ni	Cariddi 16, II, 99	0	+ 6 g.ni	—	—	—
N. 2 *variabile*	11, II, 99	0,000008	» »	—	—	—	—	—	—
» »	18, II, 99	0,000015	(—)	» »	0	0	(—)	(—)	+ 3 g.ni
N. 3 *variabile*	5, V, 98	0,00002	+ 5 g.ni	—	—	—	—	—	—
» »	13, VI, 98	»	+ 13 g.ni	—	—	—	—	—	—
» »	21, VI, 98	0,00006	(≡)	—	—	—	—	—	—
» »	27, VI, 98	»	(—)	—	—	—	—	—	—
» »	27, I, 99	»	(—)	» »	0	+ 7 g.ni	+ 5 g.ni	—	—

Invece, nella lenta scomposizione che la tossina subisce più tardi, le alterazioni del veleno sono meno gravi; il veleno va soggetto a modificazioni molto simili a quella che l'invecchiamento determina nella cultura e per le quali si produce un tossoide che nella neutralizzazione impegna a un dipresso la stessa quantità di antitossina del veleno dal quale deriva.

Così nella misurazione della potenza di un siero queste ultime alterazioni esercitano sul risultato finale molta minore influenza delle precedenti.

Da tutto questo si rileva che molto differenti sono gli effetti che le varie influenze fisiche e chimiche esercitano sul veleno del tetano. E ciò s' intende facilmente perchè non tutte le cause debbono portare le stesse identiche alterazioni nella molecola della tossina. A seconda poi che queste cause determinano la distruzione completa del veleno o la sua trasformazione in un tossoide, il valore del siero ricercato con una tossina indebolita apparirà maggiore o minore del reale.

Gli stessi risultati ha ottenuti anche il Behring colla tossina del tetano scomposta artificialmente a mezzo del tricloruro di jodo. Infatti egli ha trovato che, nella neutralizzazione col metodo della mescolanza in vitro, la tossina così indebolita, per essere completamente neutralizzata, richiede, in confronto del veleno provvisto di tutta la sua potenza, quantità maggiore di siero.

Perciò il tricloruro di jodo, come l' invecchiamento, non avrebbe per effetto di distruggere il veleno, ma di trasformarlo in un tossoide; quello che potrebbe spiegare perchè, tanto l' invecchiamento, quanto l' azione del tricloruro di jodo, servono così bene per trasformare una cultura tossica in un vaccino. Nella determinazione del siero, poi, questa scomposizione parziale del veleno porterebbe al risultato di abbassarne in ambidui i casi il valore, perchè nella neutralizzazione che si opera in vitro per mezzo di esso siero, tanto il veleno attivo che costituisce l' UT, quanto il veleno trasformato in tossoide, hanno la proprietà di esser legati dall'antitossina.

Se non fosse così non si spiegherebbe perchè gr. 0,00006 di tossina per klg, che determinano nel coniglio solo fenomeni locali di tetano, diano nella misurazione del valore di un siero lo stesso risultato di gr. 0,00002 p. klg. di tossina costante che uccide quell'animale in 5 giorni.

Anzi il Behring si serve dei fatti osservati a riguardo del tricloruro di jodo per giustificare l'insuccesso che il suo siero avrebbe dato nelle mani del Nocard nella cura del tetano sperimentale.

Peraltro egli si guarda bene d' esaminare se questa stessa causa possa avere influito sulle differenze trovate nel valore di alcuni sieri, del mio ad esempio, controllati nell'Istituto di Berlino per lo studio delle malattie da infezione. Ciò che sarebbe stato tanto più doveroso in quanto tali controlli furono fatti prima che si conoscesse il modo di avere anche per il tetano un veleno-tipo costante.

Adunque se la presenza di veleno scomposto nella tossina-campione può modificare in più o in meno il valore di un siero, e se l'influenza che questo veleno scomposto esercita sul valore del siero non può esser tenuta esattamente a calcolo, perchè varia con la causa che produce l'alterazione della tossina, non sarà affatto possibile con un veleno instabile determinare la giusta potenza del siero.

Infatti, data la presenza di un veleno scomposto, non potrà essere presa per base nello stabilire il valore del siero, nè la grossezza della UT nel momento in cui l' esperimento è praticato, nè quella che la stessa tossina aveva originariamente prima che fosse alterata. Da ciò ne viene la necessità che il veleno-cam-

pione contenga quanto meno veleno scomposto è possibile, e tanto quello che nella evoluzione naturale della cultura si produce per invecchiamento, quanto quello che si forma nella stessa tossina secca per influenze accidentali, chimiche o fisiche.

Ora del modo d'impedire che dopo la precipitazione con solfato di ammonio si scomponga del veleno abbiamo già parlato; rimane quindi a vedere come può impedirsi che al momento della precipitazione la cultura contenga veleno modificato.

A questo si provvede nel modo migliore e con bastante sicurezza servendosi per la preparazione della tossina, di culture che nel periodo del loro massimo sviluppo raggiungono sempre lo stesso grado di tossicità; per cui cm^3 0,001 del loro filtrato uccide costantemente 1 klg. di coniglio in 4 giorni.

Le culture che al momento della precipitazione con solfato di ammonio non possiedono eventualmente questa tossicità sono senz'altro scartate; così la tossina preparata da tali culture.

Per raggiungere poi questo risultato, di aver culture, cioè, che ad un determinato periodo del loro sviluppo (10-15 giorni) hanno un grado molto elevato di tossicità, ed una tossicità che si mostra costante in tutte le culture, bisogna rivolgere particolare attenzione ai mezzi di nutrizione in cui il b. del tetano è fatto sviluppare. Ai brodi ordinari devono essere sostituiti mezzi di nutrizione a composizione più costante, meno complessa; substrati nutritivi in cui entrano solo quegli elementi che favoriscono la produzione del veleno, e dove, invece, sono esclusi quelli che l'ostacolano, o da cui ha luogo lo sviluppo di prodotti che scompongono rapidamente il veleno appena questo è formato. In altro mio lavoro di prossima pubblicazione riferirò i risultati di una lunga e paziente serie di ricerche fatte in proposito, e in quella occasione dirò quale deve essere la composizione dei substrati nutritivi che meglio corrisponde a questo fine.

Per ora mi limiterò a far conoscere che questi materiali di nutrizione devono contenere solo quegli elementi che servono alla vegetazione del b. del tetano ad alla produzione del veleno; che questi elementi devono esser vicini quanto più è possibile a quelli che il b. del tetano utilizza nell'animale per generare la tossina; che il materiale d'innesto deve esser preso da culture in sangue di coniglio, dove il bacillo del tetano conserva il massimo potere vegetativo, e da culture che al momento dell'innesto si trovano in piena e completa sporificazione; che da questi substrati nutritivi speciali si sviluppano *culture che si mantengono sempre asporigene*, e che posseggono il grado più elevato di tossicità e di potere vaccinante. La più piccola variante nella composizione del materiale di nutrizione, ad es. la presenza di una piccola quantità di mucina, basta per turbare grandemente la produzione del veleno e per dare culture ad un grado di tossicità 10-15 volte minore. La forma asporigena della cultura, sta ad indicare che il b. del tetano trova in tali substrati nutritivi quelle stesse favorevoli condizioni di vita che esso bacillo rinviene nei focolai d'infezione dell'uomo e degli animali, dove appunto manca di regola qualsiasi sporificazione.

II.—*Solventi, titolo della soluzione.*

In riguardo ai solventi della tossina le mie esperienze si li-

mitano esclusivamente all'acqua distillata e alla soluzione fisiologica di cloruro di sodio.

Avendo osservato che la mescolanza del siero con una soluzione acquosa di tossina presenta un leggero intorbidamento dovuto alla precipitazione della globulina, ho voluto vedere se tale fatto potesse esercitare una qualche influenza sul valore del siero. Ma l'esperienza mi ha dimostrato che il risultato della determinazione è ugualmente esatto, tanto se la tossina viene sciolta in soluzione di cloruro di sodio a 0,75 0[0, quanto se viene sciolta semplicemente in acqua distillata.

Allo stesso modo le piccole variazioni nel titolo della soluzione non hanno grande influenza sul valore del siero. Nonostante, volendo mettere da parte anche gli errori che in proposito sarebbero stati riscontrati dal Behring, io riporto sempre ad uno stesso volume, a 1[2 cm^3, la quantità di liquido di ciascuna delle due parti che compongono la mescolanza.

III.—*Durata del contatto.*

Anche la durata del contatto non ha grande influenza sul valore del siero. Ciò almeno nei termini più confacienti ad una misurazione pratica nei quali ho creduto dover limitare l' esperienza, che nelle mie ricerche non si protrasse mai al di là di un'ora dal momento in cui fu fatta la mescolanza.

Quindi entro questo spazio di tempo ci possiamo servire della mescolanza quando vogliamo, senza che ciò porti modificazioni nel risultato dell'esperienza. Ma anche qui, per maggiore precisione, ho preso un termine fisso, praticando sempre l'iniezione dopo circa 1[2 ora di contatto della tossina col siero.

Ed ora passiamo ad esaminare *le cause perturbatrici che provengono dall'animale* e che nella valutazione di un siero col metodo della mescolanza in vitro possono modificarne il valore.

I. — *Sensibilità dell'animale per il veleno del tetano.*

L'influenza che la diversa sensibilità dello animale per il veleno del tetano può esercitare sul valore del siero nella misurazio ne col metodo della mescolanza in vitro costituisce uno dei problemi più importanti da studiare, sia dal lato scientifico, sia dal lato pratico.

Tale problema per essere esattamente risolto richiede dapprima sia bene stabilito quale è la sensibilità per il veleno del tetano dei varii animali sui quali la mescolanza di siero e tossina deve essere sperimentata.

Gia in alcune mie precedenti ricerche fatte con culture liquide o con tossina solida non assolutamente costante, io aveva trovato che la sensibilità del coniglio è superiore a quella del topolino e questa a quella del ratto. Se rappresentavo con 1 la dose mortale del coniglio trovavo che questa sta a quella del topolino e del ratto come 1 : 1,5 : 4 ; ciò che equivaleva a dire che la sensibilità del coniglio per il veleno del tetano sta a quella del topolino e del ratto come $1 : {}^2/_3 : {}^1/_4$.

In queste nuove ricerche ho voluto saggiare la sensibilità dei vari animali contro un veleno solido fisso, quello preparato il 7, III, 99, che mi aveva servito in tutte le prove colla mescolanza; e per queste ricerche mi sono valso della cavia, del coniglio, del topolino che sono gli animali i quali servono ordinariamente per determinare in modo comparativo la potenza di una tossina.

Le iniezioni nei tre animali erano fatte sempre con la stessa soluzione di tossina; il veleno introdotto era sempre calcolato sul peso in grammi dell'animale.

Nella seguente tabella sono riportati i risultati di questi esperimenti:

Animali in esperimento	Peso in grm.	Dose per gr. della tossina iniettata	Risultati
Cavia	290	0,000000005	(—)
»	530	0,0000000075	+ 5 giorni
»	640	0,00000001	+ 3 giorni
»	740	» »	+ 3 giorni e 7 h.
»	350	» »	+ 3 $^1/_2$ giorni
»	340	0,000000015	+ 3 giorni
»	500	0,00000002	+ 66 h.
»	500	0,00000003	+ 66 h.
Coniglio	1150	0,00000002	+ 5 giorni
»	900	» »	+ 5 giorni
»	1190	» »	+ 4 giorni
»	1220	» »	+ 5 giorni
»	1310	» »	+ 4 giorni
Topo bianco	17$^1/_2$	0,00000002	(—)
»	13	0,000000025	(—)
»	18	0,00000003	(=)
»	17	0,000000035	(=)
»	21	0,0000000375	(≡) regresso dopo 8 g.ni
»	21	0,00000004	(≡) regresso dopo 10 g.ni
»	19	0,0000000425	(≡) Idem
»	18	0,000000045	+ 7 giorni
»	19	0,0000000475	+ 3 giorni
»	21	» »	+ 5 giorni

Adunque, nella tossina sperimentata, la minima dose mortale calcolata in rapporto al peso in gr. dell'animale è di

gr. 0,0000000075 per la cavia
» 0,00000002 per il coniglio
» 0,0000000475 per il topolino.

Ciò stà a significare che la sensibilità della cavia per tale tossina è circa il doppio di quella del coniglio, e questa quasi 2 $^1/_2$ volte superiore a quella del topolino; o, in termini più precisi, che la cavia è 2,666 volte più sensibile e il topolino 2,375 volte meno sensibile del coniglio. In altre parole, per uccidere il coniglio ci vuole una quantità di tossina 2,666 volte maggiore e 4,375 volte minore di quella necessaria per uccidere rispettivamente la cavia e il topolino.

La differenza trovata oggi fra coniglio e topolino nella sensibilità per il veleno del tetano è quindi un poco maggiore di quella rilevata nelle precedenti ricerche.

Ma i risultati che sopra abbiamo riportati, oltre a farci meglio e più largamente conoscere le differenze nel grado della

sensibilità dei vari animali per il veleno del tetano, ci permettono ancora di stabilire un più esatto confronto fra la nostra tossina e quella preparata da altri.

Con questi soli dati, peraltro, e senza sapere la quantità percentuale di precipitato che si ricava nei singoli casi dalle culture del tetano, non è possibile risalire al valore assoluto delle rispettive culture originali e stabilire un' esatta comparazione della loro potenza.

Infatti varia moltissimo la quantità di precipitato secco che si ottiene da una determinata quantità di cultura; e ciò, non solo in rapporto alle particolari proprietà del b. del tetano ed alla composizione dei substrati nutritivi, ma anche in riguardo a molte altre condizioni che ci sfuggono; condizioni le quali portano a differenze notevoli anche nei filtrati di culture avute dal medesimo bacillo e trattate tutte allo stesso modo.

A prova di questo basta ricordare che il Brieger ottenne da un litro di cultura in brodo 1 gr. di precipitato, mentre io ricavo dalla stessa quantità di cultura sviluppata sopra substrati nutritivi speciali 12-14 gr. di tossina.

Ne viene da questo che la quantità di cultura corrispondente nei suoi effetti ad una determinata dose di veleno sarà di tanto maggiore (e conseguentemente di tanto minore sarà la tossicità della cultura stessa) di quanto sarà minore la quantità di precipitato secco che se ne ricava.

Riportandosi, quindi, all'esempio sopra ricordato, nel mio caso la stessa dose di tossina starà ad indicare culture 12-14 volte più attive di quelle che servirono a Brieger e servono in generale alla scuola tedesca per preparare il veleno del tetano.

Per mettere un pò di rigore in mezzo a tanta variabilità di risultati, Knorr e Behring riportano la velenosità dei loro precipitati a quella di 1 gr. di un determinato veleno che è preso come tipo normale (Testgift N. 1) e che è capace di uccidere 150.000.000 gr. di topolino: ossia, come si esprime il Behring che ha un valore di 150.000.000 + Ms.

Io preferisco, invece, calcolare la potenza delle culture dalla loro tossicità originale; e poichè le mie culture di regola hanno nel coniglio lo stesso grado di tossicità, equivalente a cm^3 0,001 p. klg., così 1 cm^3 di tali culture conterrà la quantità di veleno capace di uccidere in 4-5 giorni 1.000.000 gr. di coniglio; ossia, volendo adottare lo stesso linguaggio del Behring, 1 cm^3 di tali culture avrà un valore tossico di 1.000.000 + Coniglio.

In tal modo abbiamo un punto di partenza fisso dal quale è facile risalire al valore tossico che 1 cm^3 della stessa cultura avrà nella cavia e nel topolino, conoscendo il rapporto che passa fra la sensibilità del coniglio per il veleno del tetano e quella degli altri animali ricordati.

Così 1 cm^3 della mia cultura, che viene preso come unità di misura, darà i seguenti valori tossici:

2.666.000 + Cv. (cavia)
1.000.000 + Cgl. (coniglio
424.000 + Tpl (topolino).

Solo con questi dati, che per le culture del Behring portate al loro grado massimo di tossicità finora ci mancano, come ci mancano indicazioni precise sulla quantità percentuale di veleno

secco che se ne ricava, si potrà fare un esatto confronto fra la tossicità assoluta delle rispettive culture originali.

Peraltro, se ci si riferisce a quel poco che in proposito si conosce, si deve ritenere che le mie culture, almeno per il coniglio, sono immensamente più tossiche di quelle degli altri, dal momento che di queste occorrono $2\,{}^1/_2 - 3$ cm³ per uccidere in 4-5 giorni conigli del peso di 1500-2000 gr., mentre delle mie è sufficiente cm³ 0,001 p. klg. per ottenere lo stesso effetto.

Ma se non è possibile un confronto fra la tossicità assoluta delle culture originali, è possibile invece, cogli elementi che oggi possediamo, stabilire un'esatta comparazione fra gli effetti tossici che il veleno del tetano determina nei vari animali.

Infatti, se finora mancarono dati sicuri per giudicare, perchè le poche esperienze del Dr. Wladimiroff sono state fatte con cultura poco adatta allo scopo, cioè con una cultura vecchia non filtrata e per di più addizionata di ac. fenico, invece oggi abbiamo nelle ricerche del Dr. Knorr, eseguite come le mie con veleno secco costante, tutto quanto può occorrere per questa comparazione.

In tali ricerche il Dr. Knorr, valendosi della stessa tossina che ha servito per gli studi del Behring e che è usata come veleno-tipo nella valutazione del suo siero, ha trovato che di contro a quel veleno, il topolino è 150 volte e la cavia 1000 volte più sensibile del coniglio; ossia che per uccidere il coniglio occorre per gr. una dose di veleno 150 volte superiore a quella del topolino, 1000 volte superiore a quella della cavia.

Abbiamo perciò questa notevole differenza fra la mia tossina e quella della Germania; che di contro alla mia il coniglio è assai più sensibile del topolino, e che la differenza nella sensibilità fra coniglio e cavia è, colla mia tossina, immensamente piu piccola, quasi 500 volte minore di quella che si ha colla tossina del Behring.

Dopo questo si comprendono facilmente le critiche mosse alle esperienze sul coniglio, e si capisce come questo animale, che per me è preziosissimo perchè dopo la cavia è fra gli animali da laboratorio uno dei più sensibili al veleno del tetano, invece non possa servire, o serva molto male nelle, esperienze fatte con culture di altra provenienza.

Infatti, se la quantità di cultura che si deve iniettare è molto grande, questa influenzerà sempre in modo sfavorevole il risultato della ricerca, qualunque sia il genere degli esperimenti che con tale cultura si vogliono praticare.

Questi fatti mi danno occasione di fermarmi ancora sopra una questione della quale ho parlato più volte nei miei lavori, ma sulla quale non credo aver richiamato a sufficienza l'attenzione degli esperimentatori; sulle differenze, cioè, che passano fra le mie culture del tetano e quelle possedute da altri. Le mie culture posseggono, infatti, caratteri batteriologici speciali, la tossina che producono si distingue facilmente da quella di altra provenienza per la sua azione sugli animali, per il modo di comportarsi di fronte agli agenti chimici e fisici.

Nelle culture già l'esame microscopico lascia vedere delle piccole differenze; differenze che si possono rilevare anche dal confronto dei rispettivi fotogrammi. I bacilli e i filamenti delle mie

culture hanno una grossezza maggiore di quelli delle altre; i filamenti sono molto più lunghi, i rigonfiamenti e le spore terminali fanno maggiore sporgenza sul corpo del bacillo. Ma la vera caratteristica batteriologica differenziale consiste nella proprietà che hanno le mie culture di coagulare il siero del sangue, proprietà di cui nessun altro che siasi occuputo del b. del tetano fa menzione. Questa coagulazione avviene in qua lunque siero (coniglio, cavallo, asino), anche se questo è reso incoagulabile al calore con l'aggiunta di nutrosio e se il fibrinofermento che contiene fu distrutto colla ebullizione (liquido di Wassermann); si osserva pure questa coagulazione nella soluzione normale di globulina preparata dal sangue di cavallo e addizionata con peptone 1 $^{0}/_{0}$, per quanto ciò avvenga molto più tardi ed il coagulo sia in quantità molto minore che nel corrispondente siero originale. Dopo il coagulo si ridiscioglie lentamente, ma mai in modo completo.

Nel siero di coniglio e di cavallo, in confronto a quello di asino, la coagulazione è più pronta, il coagulo più compatto, la dissoluzione successiva di questo più rapida e più completa. Quello che è rimarchevole si è che questa coagulazione manca quando, invece di servirsi del solo siero, si adopra sangue in toto o sangue defibrinato; che anzi nel primo caso anche il coagulo di fibrina poco a poco si scioglie e in modo completo.

É anche degno di particolare attenzione il fatto che nella coagulazione in parola la reazione del siero non cambia affatto, e che tale coagulazione, perciò, avviene in un mezzo *marcatamente alcalino*.

Riguardo alle differenze intorno all'azione della tossina sugli animali, sopratutto alla maggiore sensibilità che il coniglio offre per il veleno delle mie culture, per la quale questo animale apparisce quasi così sensibile a tale veleno come la cavia, ne abbiamo già detto abbastanza di sopra.

Finalmente la mia tossina si distingue da quella posseduta da altri per la sua grandissima labilitá, per la sua maggiore sensibilità agli acidi e per la maggiore resistenza alle alte temperature. Basta appena una traccia di acido, tanto minerale quanto organico, perchè la mia tossina, a differenza delle altre, sollecitamente si scomponga e diventi inattiva. Invece la temperatura di 65° C. per un'ora non distrugge completamente la tossicità delle mie culture, per cui queste alla dose di 1/2 cm^3 uccidono ancora il topolino nel termine di 2 giorni, mentre la stessa temperatura, per la stessa durata della sua azione, rende completamente inattive quelle del Behring studiate dal Dottr Knorr.

Non vi ha quindi dubbio che le mie culture si distinguono dalle altre, sia per alcuni caratteri batteriologici, sia per l'azione e le proprietà della tossina che producono.

Quale è dunque la ragione di queste differenze? Evidentemente le differenze notate non possono ricevere che le due interpretazioni seguenti: o le mie culture sono date da una *razza* speciale di bacilli normalmente orientata verso il coniglio e avente caratteri e proprietà speciali, o queste culture hanno artificialmente acquistato un nuovo tipo per graduale adattamento ai mezzi di nutrizione nei quali la cultura è stata praticata. Di queste due ipotesi ritengo più probabile la prima, sia perchè le

mie culture fino dalla loro origine, quando furono isolate dall'uomo, presentarono le caratteristiche differenziali notate, sia perchè queste culture non subirono mai nessun cambiamento nei caratteri sopraricordati per il passaggio più volte ripetuto attraverso gli ordinarii mezzi di nutrizione.

In ogni modo è impossibile che due tossine le quali hanno azione così diversa negli animali e una resistenza così differente di fronte agli agenti chimici e fisici producano antitossine assolutamente eguali. Se è vero, come tutti oggi ritengono, che la qualità e l'azione specifica della antitossina sono sempre in rapporto con quelle della tossina, se è vero che bastano piccole differenze in una cultura, come quelle che si verificano nei varii tipi di streptococchi, per ottenere antitossine che non si equivalgono, bisogna necessariamente ammettere, una volta riconosciuta la differenza considerevole fra la mia tossina e quella proveniente da altre culture, che la mia antitossina deve essere differente dalle altre.

Ma ammessa questa diversità nelle antitossine quale di esse sarà la più efficace nella cura del tetano? E' questo un argomento difficile e assai delicato che non può esser risolto qui incidentalmente, ma che deve esser trattato largamente sulla scorta dei fatti.

Certo che dal solo potere antitossico di un siero, non si può giudicare della sua potenza curativa, della sua superiorità sugli altri sieri, dal momento che esistono sostanze le quali nulla hanno di comune colle antitossine, che non hanno quindi nessuna azione curativa, e che nonostante possono neutralizzare in vitro il veleno del tetano, come è stato benissimo messo in chiaro dalle esperienze di Wassermann e Takaki. Il giudizio sulla efficacia curativa delle varie antitossine, perciò, deve esser dato direttamente dalla prova clinica e dallo esperimento.

E la prova clinica, oramai abbastanza larga, si è mostrata tutt'altro che sfavorevole alla mia antitossina. La maggiore efficacia di questa di contro alle altre antitossine (Behring, Roux, British Institute of Preventive Medecine etc.) risulta chiaramente dalle statistiche inglesi; e nemmeno gli osservatori spassionati della Germania che hanno avuto occasione di sperimentare varii sieri osano abbassare la potenza curativa del mio al disotto di quella del siero Behring.

Del resto nel leggere le numerose storie cliniche di casi di tetano trattati colla cura specifica è facile persuadersi che i varii sieri adoprati hanno efficacia molto diversa. Senza bisogno di ricordare quei sieri che si mostrarono di pochissima o di nessuna efficacia (vom Mass. State Board of Health) anche se iniettati in quantità colossali (fino a 3400 cm^3 in 11 giorni) spesso accade di rilevare che dosi molto piccole della mia antitossina hanno dato effetti più pronti e più sicuri di dosi assai maggiori della antitossina Behring e della antitossina Roux, che sono evidentemente le più efficaci di quelle che oggi si trovano in commercio; ciò senza escludere che di fronte ai rispettivi veleni queste antitossine possano avere un potere antitossico eguale se non maggiore della mia. Più significanti sono ancora quei casi in cui dall'antitossina Roux non si ebbe nessun vantaggio, mentre da quella mia adoprata più tardi si ottennero effetti meravigliosi

e l' ammalato passò presto da uno stato di agitazione in uno di calma.

Ma questa questione, come ho detto, mi riserbo di trattarla più largamente in seguito. In tale occasione riferirò ancora i risultati ottenuti colla mia antitossina sui quadrupedi dell'Esercito affetti da tetano e sottoposti tutti indistintamente alla cura specifica; prova questa significantissima, sia per la grande recettività del cavallo a quella infezione, sia perchè una statistica esatta di quest' ultimo decennio ci permette di giudicare con tutto il rigore possibile sui risultati della cura col siero antitetanico in confronto a quelli della cura praticata coi mezzi ordinari. Solo mi limiterò a dire che i dati fin qui raccolti confermano, anche per il tetano del cavallo, la superiorità della mia antitossina su quella Behring.

Pure in altro lavoro riferirò con tutti i particolari le esperienze eseguite negli animali da laboratorio sulla cura del tetano; esperienze in cui sarà inoltre provata comparativamente, di contro alla mia tossina, l'azione dei sieri maggiormente conosciuti.

Per ora mi basta accennare che in queste esperienze il mio siero si è mostrato efficacissimo in tutti gli animali, cavia, coniglio, topolino; che nel tetano sperimentale a decorso rapido (morte in 70 h.) l' iniezione del siero salva l' animale fino a tutto il 1° terzo della malattia; finalmente che nel tetano a decorso più lento (morte in 4-5 giorni) si riesce ancora a salvare l'animale quando l'iniezione del siero è praticata entro la metà o al massimo entro i primi dei due terzi della malattia.

Ed ora, dopo avere stabilito bene quale è la differenza nella sensibilità per il veleno del tetano degli animali da laboratorio sopra ricordati, vediamo se e quale influenza possa esercitare sulla determinazione del valore antitossico del siero col metodo della mescolanza in vitro la maggiore o minore recettività dell'animale per tale veleno.

In proposito posso dire molto brevemente, che se la neutralizzazione del veleno è completa, l'iniezione della mescolanza riesce indifferente in tutti e tre gli animali: coniglio, cavia e topolino.

A prova di questo mi limito a riportare un solo esempio, perchè tutte le volte che ebbi occasione di riportare l' esperimento ottenni sempre lo stesso risultato. Fra le molte prove eseguite scelgo quella praticata comparativamente sul coniglio e sul topolino, perchè questi due animali sono quelli che oggi servono esclusivamente per la determinazione del siero antitetanico, il primo per la valutazione del mio, il secondo per quella del siero Behring. Il siero sperimentato era stato raccolto dal cavallo Cariddi il 16, II, 99; la tossina di cui mi sono servito era quella costante preparata il 7, III, 99; la UT era calcolata in ragione di 0,00000002 p. gram.

Animale in esperimento	Valore della mescolanza			
	40.000	60.000	80.000	100.000
Coniglio	0	0	0	+ 7 g.ni
Topolino	0	0	0	+ 4 g.ni

Dunque la stessa mescolanza ha dato risultati identici nel topolino e nel coniglio, indipendentemente dalla loro diversa sensibilità per il veleno del tetano.

Naturalmente le cose sono un poco diverse se si esperimenta con una mescolanza nella quale la tossina non sia neutralizzata in modo completo. In questo caso l' eccedenza del veleno sarà più facilmente e con fenomeni più gravi rilevata dall' animale più sensibile; per cui mentre la stessa mescolanza determinerà nel coniglio sintomi di tetano limitati all' arto inoculato, darà luogo nella cavia a tetano generalizzato ed anche a morte.

Quindi, se nella determinazione del valore del siero si prende a base una unità fissa di veleno, e come limite per il giudizio si accetta solo il caso in cui l'animale non ha risentito nulla della praticata operazione (Limes glatt) riesce indifferente eseguire la prova della mescolanza in qualunque dei tre animali sopra ricordati.

Ma se invece si volesse accettare come UT quella propria a ciascun animale, allora il valore del siero crescerebbe o diminuirebbe in proporzione della minore o maggiore grossezza della UT contro la quale viene saggiato. Per questa ragione io sono stato costretto a prendere nella valutazione del mio siero una UT fissa, e convenzionalmente ho scelto quella del coniglio, perchè il coniglio è l'animale che più di frequente mi serve in tale determinazione.

Quindi le cifre che indicano i valori del mio siero si riferiscono sempre alla UT del coniglio qualunque sia l' animale in cui viene fatta la prova della mescolanza.

II. — *Peso dell'animale.*

Quando si prende per norma della determinazione di un siero la neutralizzazione completa del veleno contenuto nella mescolanza, anche differenze considerevoli nel peso dello animale non esercitano nessuna influenza sul risultato dello esperimento. Ciò è troppo facile a comprendersi perchè io debba riportare qui degli esempi, per i quali del resto possono servire benissimo alcuni degli esperimenti riferiti nel corso di questo lavoro. Che se invece si volesse giudicare in questa misurazione da una incompleta neutralizzazione del veleno, allora il peso dell'animale non potrebbe essere in nessun modo trascurato, perchè l'eccedenza del veleno tanto più farebbe risentire i suoi effetti quanto minore è la massa del corpo sulla quale agisce; per cui, a parità di condizioni, il valore del siero sarebbe proporzionatamente maggiore quanto maggiore è il peso dell' animale sul quale si esperimenta.

Vedi in proposito l'esempio precedentemente riportato in cui

il siero del valore di 80.000 UI provato al valore di 100.000 dà solo fenomeni locali in un coniglio del peso di 2010 gr., determina, invece, la morte in 5 giorni in un coniglio del peso di gr. 1120. Egualmente lo stesso siero a 80.000 non dà nessun fenomeno di tetano nel coniglio e nel topolino, mentre a 100.000 uccide il 1° di questi animali in 7 giorni, il 2° solo in 4. In questo caso, naturalmente, oltre all'influenza del peso del corpo, bisogna tener conto anche della diversa sensibilità degli animali per il veleno del tetano.

Emerge da tutto questo che molto numerose e complesse sono le condizioni alle quali bisogna soddisfare, oltre quella capitale di possedere un veleno-campione costante, per fare sul siero antitetanico una determinazione assolutamente esatta. Basta trascurare una solamente di queste condizioni perche il valore di un siero cambii considerevolmente.

Il siero antitetanico offre quindi grandissime difficoltà per il controllo; e chi deve lottare giornalmente contro queste difficoltà non comprende davvero come tale controllo possa essere imposto per legge, a meno che la stessa persona che ha preparato il siero, si presti a dimostrare l'esattezza del valore che gli ha assegnato.

Da ciò si comprendono facilmente le differenze trovate nel valore di un siero quando questo fu riscontrato da altra mano, e per giunta con un veleno-campione differente. Immaginarsi poi quale significato debbono avere i controlli fatti, non solo con veleno-tipo differente, ma anche con metodo di misurazione diverso!

Eppure di tali controlli ci si è serviti e ci si serve ancora per gettare il discredito sopra alcuni sieri antitetanici fra i più noti e meglio apprezzati dal pubblico.

Ma impressione anche più penosa si riceve quando si legge che di questi dati, che oggi hanno perduto ogni valore, seguitano a valersi, come di un ritornello obbligato, scienziati molto autorevoli per oppugnare il giudizio favorevole perfino di chi ha potuto provare direttamente sull'uomo l'efficacia del siero in questione.

Invece da quanto si è detto risulta che, per rilevare in modo preciso il valore di un siero e stabilire un confronto fra più sieri di diversa provenienza, bisogna anzitutto determinarne il potere antitossico di contro ad uno stesso veleno-tipo.

Ma questo non basta perchè, come abbiamo ricordato, vi sono sostanze sprovviste di qualsiasi azione specifica sugli animali le quali possono neutralizzare in vitro una certa quantità di veleno. Quindi la valutazione di un siero col metodo della mescolanza in vitro avrà un'importanza molto relativa se in pari tempo non sarà dimostrato che ad un determinato valore antitossico corrisponde una data potenza curativa; dacchè è appunto per la loro efficacia terapeutica che questi sieri devono servire nella pratica.

La determinazione per i sieri antitetanici più conosciuti di questo rapporto fra valore antitossico e valore curativo forma soggetto delle attuali nostre ricerche.

Stabilite le condizioni che sono necessarie per fare una valutazione esatta del siero col metodo della mescolanza in vitro,

vediamo adesso con quali criteri e in qual modo tale valutazione si esegua nel caso pratico.

Il Behring per provvedere agli errori che nella misurazione del valore di un siero potrebbero derivare dalla diversa tossicità del veleno-campione e della presenza in questo di una certa quantità di veleno scomposto, riporta la tossicità del veleno col quale viene fatta la prova a quella del *veleno-tipo-normale* (Tetanusnormalgift = Testgift. N. 1) che nella sua unità di misura rappresentata dal gr. uccide in 4-5 giorni, come abbiamo veduto, 150.000.000 gr. di topolino (150.000.000 + Ms.).

Dall'altro lato paragona il valore trovato nel siero in esperimento con quello di un siero di forza conosciuta che egli chiama *siero-tipo-normale* (Tetanusnormalheilserum, Tetanus-Testantitoxin). È per siero-tipo (Tet. A. N^1) il Behring intende quello dei suoi sieri che iniettato preventivamente nel topolino alla distanza di 20 ore dalla iniezione della UT salva l'animale dalla morte; 0,1 cm^3 di questo siero neutralizza completamente in vitro gr. 0,03 del veleno-tipo normale, ossia la quantità di veleno corrispondente al valore di 4.500.000 + Ms., capace di uccidere, cioè, 4.500.000 gr, di topolino. Tale valore del siero normale è rappresentato dal Behring colla seguente equazione:

0,1 cm^3 Tet. AN^1 plus. 4.500.000 + Ms. = LO (Limes glatt).

Ora se nella misurazione si trova che un dato siero neutralizza una quantità di veleno che è 10-100 volte superiore a quella che nelle stesse condizioni è resa completamente inattiva dal siero normale, si dirà che quel siero ha una potenza 10-100 volte superiore a quella del siero-tipo-normale, ciò che viene significato dal Behring colla espressione Tet. AN^{10}- Tet.AN^{100}.

Deve notarsi, poi, che il valore del siero solido, quale è quello che trovasi in commerciò, è 10 volte superiore al valore del corrispondente siero liquido, perchè appunto il siero di cavallo dà la 10ª parte circa di residuo solido. Quindi il valore Tet. AN^{100} attribuito ad un siero solido non starà a rappresentare un siero 100 volte superiore nella sua potenza curativa al siero anormale, ma solo 10.

Ora questo metodo di rappresentare il valore del siero è troppo personale perchè possa essere generalizzato. Tale metodo, infatti, si riferisce a due tipi speciali di veleno e di siero che solo il Behring possiede, e che non possono perciò diventare termini generali di confronto.

Seguendo l'esempio del Behring ciascuno potrebbe scegliere i proprii tipi di paragone, e poichè da questi dipende essenzialmente il valore attribuito al siero, così le cifre che esprimono i singoli valori avrebbero in ciascun caso un significato molto differente.

Troppa è la confusione che regna oggi nel modo di rappresentare il valore di un siero antitetanico perchè non debba esser sentito universalmente il bisogno di diminuirla, anzi che di aumentarla, adoperando un linguaggio che sia comune a tutti e che da tutti possa essere facilmente compreso. Nello stato attuale delle cose la confusione è arrivata a tal punto che nemmeno quelli i quali in modo particolare si occupano dell' argomento possono giudicare, dal valore attribuito a due sieri di pro-

venienza diversa, quale sia effettivamente il rapporto della loro potenza.

E così che si spiega come in questa misurazione del valore di un siero vengano fuori delle cifre, ora veramente iperboliche, ora assai modeste; ora finalmente se ne ricavano espressioni, come quelle del Behring, che costituiscono una nomenclatura tutta speciale, non paragonabile a nessuna di quelle fin qui note, e della quale solo in modo approssimativo, e dopo un calcolo abbastanza lungo, si può intendere il significato.

Per maggiore semplicità ed intelligenza io credo, invece, che nella misurazione del siero antitetanico debba adottarsi lo stesso metodo che serve per la valutazione in vitro del siero antidifterico; debba ricercarsi, cioè, quante UT sono neutralizzate da 1 cm³ di siero o da 0,1 gr. di antitossina secca che gli corrisponde. E per il tetano l' UT è così sicura che non vi è bisogno di servirsi nel calcolo del decimultiplo di essa. Questo metodo, oltre al merito della semplicità, ha quello di esser facilmente inteso da tutti, appunto perchè tale metodo, che è in uso da tempo per indicare il valore del siero antidifterico, è già entrato nel linguaggio comune.

L' ostacolo che poteva opporsi per adottare questo modo di valutazione del siero, quello cioè di avere un veleno costante, è stato ormai rimosso.

Alla incostanza della coltura liquida si è provveduto fissando allo stato solido la tossina che contiene nel momento più favorevole del suo sviluppo. E poichè questa tossina è ottenuta sempre da culture che hanno la stessa velenosità, da culture, cioè, che alla dose di 0,001 per klg. uccidono il coniglio in 4 giorni, così sarà sempre eguale, o con differenze trascurabili, il termine di confronto del siero. Solo, perchè i valori abbiano un significato pratico, bisognerà vedere quante UT di un siero, determinate col metodo della mescolanza in vitro, e che meglio dovrebbero dirsi unità antitossiche, occorrano nella cura del tetano, sia in rapporto alla gravezza della malattia, sia in rapporto al momento nel quale s'interviene colla cura specifica.

Questo non può dire altro che la clinica e l'esperimento; e l'esperimento troverà in proposito larghissimo campo nel lavoro al quale poco sopra ho accennato.

Detto ciò, ecco come io pratico la valutazione del mio siero:

Preparo due soluzioni titolate. una di tossina e una di siero, la prima in acqua distillata, la seconda in acqua, salata a 0,75 %; mescolo delle due soluzioni della quantità che corrisponde per ciascuna di esse alla 1000ª parte del titolo che voglio provare; riduco la mescolanza a 1 cm³ per aggiunta di acqua e dopo $^1/_2$ ora di contatto inietto l'intero cm³ alla parte posteriore della coscia di un coniglio di peso di kil. 1 circa.

Quando faccio la prova nel topolino, allora, seguendo l' esempio del Behring, mescolo di ciascuna delle due soluzioni di siero e tossina quella quantità che corrisponde alla 10ª parte del titolo che voglio provare, riduco la mescolanza a 1 cm³, di cui inietto i $^4/_{10}$, dopo un contatto di $^1/_2$ ora.

Il valore del siero è sempre calcolato sul titolo della mescolanza che non determina negli animali nessun fenomeno di malattia.

BIBLIOGRAFIA

T i z z o n i. Vaccinazione e sieroterapia contro il tetano. Contribuzione allo studio del meccanismo della immunità. F. Vallardi, Milano, pag. 93 e seg.—B e h r i n g u. R a n s o m. Ueber Tetanusgift und Tetanusantitoxin. *Deutsche med. Wochenschr.*, n. 12, 24 marzo 1898. — B e h r i n g. Ueber die Beziehung der Blutantitoxine zu den zugehörigen Infektionsgiften. *Deutsche med. Wochenschr.* n. 1, 5 januar 1899. —B e h r i n g. Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten (Lehrbuch der allgemeinen Therapie von E u l e n b u r g u. S a m u e l). — K o s s e l e W a s s e r m a n n. Ueber Gewinnung und Vervendung des Diphtherieheilserums. *Deutsche med. Wochenschr.* n. 16, 19 apr. 1894. — C o u r m o n t. Le Tétanos. Baillière, Paris 1899, pag. 10 — B r i e g e r u. F r ä n k e l. Untersuchungen über Bakteriengifte. *Berliner klin. Wochenschr.* 1890, n. 11 e 12 —B u c h n e r. *Arch. f. exp. Pathol.*, Bd. XXVII, pag. 144.—K n o r r. Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit des Tetanus durch Tetanusheilserum. Habilitationsschrift. Marburg. 1895, pag. 9.—B r i e g e r. Erwiderung betreffend das trockene Tetanusgift. *Deutsche med. Wochenschr.*, n. 8, 22 febb. 1894. — B r i e g e r u. C o h n. Untersuchungen über das Tetanusgift. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. XV, 1893, pag. 8.— B r i e g e r u. C o h n. Beiträge zur Concentrirung der gegen Wundstarrkrampf schützenden Substanz aus der Milch. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. XV, 1893, pag. 443. — B e h r i n g. Allg. Therapie der Infectionskrankheiten, pag. 965 e seg.—T i z z o n i. Untersuchungen über das Tetanusgift. *Arch. f. exper. Pathologie u. Pharmakologie*, Bd. XXVII, pag. 440 e seg. — B r i e g e r. Untersuchungen über das Tetanusgift. Lav. cit. pag. 5.—B e h r i n g. Ueber Immunisirung u. Heilung v. Versuchthieren beim Tetanus. *Zeitschr. f. Hygiene* etc., Bd. XII, pag. 48. — R o u x et B o r r e l. Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos. *Annales de l'Institut Pasteur*, n. 4, 1898, p. 229. — W l a d i m i r o f f. Ueber die antitoxinerzeugende und immunisirende Wirkung des Tetanusgiftes bei Thieren. *Zeitschr. f. Hygiene* etc, Bd. XV, pag. 405 e seg. — K a n t h a c k A. A. The value of serum treatment in tetanus, *Med. Chronicle*, Vol. III, p. 72. — E n g e l m a n n. Zur Serumtherapie des Tetanus. *Münch. med. Wochenschr.* 1897, n. 32-34. — H o m a n s J. Two cases of tetanus, both treated with antitetanic serum, both fatal. *Boston med. and surg. Journ.* Vol. CXXXVIII, 1898, pag. 519-520. — L u n d F. B. Two cases of tetanus treated with antitoxin. *Boston med. and surg. Journal*, Vol. CXXXVIII, p. 295-297. — M i x t e r S. T. A case of tetanus, treated with large doses of the antitoxic serum; recovery. *Boston med. and surg. Journ.* Vol. CXXXIX, 1898, p. 344-346. — C h a l m e r s. A. *Lancet*, 5 giugno 1897.